Aus der Königl. Chirurgischen Universitätsklinik zu Kiel
(Direktor: Prof. Dr. Anschütz)

Versuche über die Bedingungen der Eisenreaktion im Knochengewebe

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der hohen medizinischen Fakultät
der Königl. Christian-Albrechts-Universität
zu Kiel.

Vorgelegt von

Paul Rupprecht
aus Magdeburg

LEIPZIG
Druck von Sturm & Koppe (A. Dennhardt)
1913

Aus der Königl. Chirurgischen Universitätsklinik zu Kiel
(Direktor: Prof. Dr. Anschütz)

Versuche über die Bedingungen der Eisenreaktion im Knochengewebe

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der hohen medizinischen Fakultät
der Königl. Christian-Albrechts-Universität
zu Kiel.

Vorgelegt von

Paul Rupprecht
aus Magdeburg

LEIPZIG
Druck von Sturm & Koppe (A. Dennhardt)
1913

No. 64.

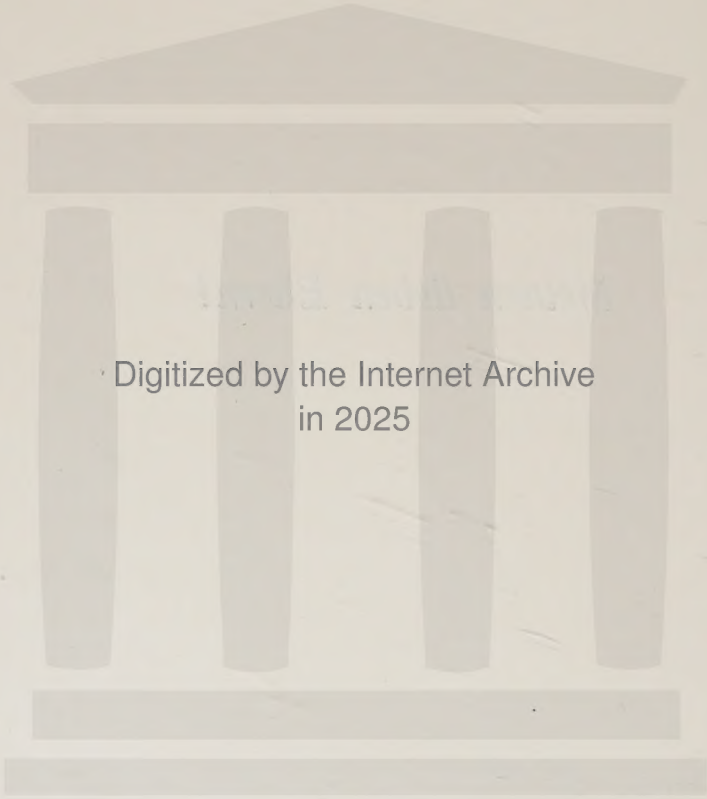
Rektoratsjahr 1911/12.

Referent: Prof. Anschütz.

Zum Druck genehmigt:

Prof. Heine
z. Zt. Dekan.

Meinen lieben Eltern!



Digitized by the Internet Archive
in 2025

https://archive.org/details/versucheuberdieb0000unse

Literatur-Verzeichnis.

1. Abderhalden, Die Resorption des Eisens, sein Verhalten im Organismus und seine Ausscheidung. Zeitschrift für Biologie. 39, 113.
2. Arnold, Über Siderosis und siderofere Zellen, zugleich ein Beitrag zur Granulalehre. 1900. Bd. 161. Virchows Archiv.
3. Baldoni, Ein Beitrag zur biologischen Kenntnis des Eisens. Archiv für exp. Pathol. und Therapie 52, 61 (1905).
4. Bunge, Über die Assimilation des Eisens. Zeitschrift für physiol. Chemie 7, 49 (1884).
5. Cloetta, Über die Resorption des Eisens in Form von Haematin und Haemoglobin im Magen und Darmkanal. Archiv für exp. Pathol. und Pharmokologie 37, 69 (1895).
6. Eger, Über die Regeneration des Blutes und seiner Komponenten nach Blutverlusten und die Einwirkung des Eisens auf die Organe. Zeitschr. für klin. Medizin 32, 325 (1897).
7. Eliascheff, Gibt es eine Eisenreaktion verkalkter Gewebe? Zieglers Beiträge zur pathol. Anatomie und zur allg. Pathologie. Bd. 50, 1911, H. 3.
8. Gaule, Resorption von Eisen und Synthese von Haemoglobin. Zeitschr. für Biologie 35, 377 (1897).
9. Gierke, Über den Eisengehalt verkalkter Gewebe unter normalen und pathologischen Bedingungen. Virchows Archiv 167, 318 (1902).
10. Glävecke, Über die Ausscheidung und Verteilung des Eisens im tierischen Organismus nach Einspritzung von Eisensalzen. Inaugural-Dissert., Kiel 1883.
11. Gottlieb, Beiträge zur Kenntnis der Eisenausscheidung durch den Harn.
12. Hall, Über das Verhalten des Eisens im tierischen Organismus. Archiv für Anatomie und Physiol. 1894, Heft 5 und 6.
13. Hochhaus und Quincke, Über Eisenresorption und Ausscheidung im Darmkanal. Archiv für exp. Pathologie und Pharmokologie 37, 159 (1896).
14. Hofmann, A., Über Eisenresorption und Auscheidung im menschlichen und tierischen Organismus. Virchows Archiv 151 (484) (1898).
15. Hofmann, A., Die Rolle des Eisens bei der Blutbildung. Ebenda 160, 235 (1900).

16. Honigmann, Bemerkungen zur Frage über die Eisenresorption und Eisenausscheidung beim Menschen. Virchows Archiv 152, 191.
17. Hueck, Beiträge zur Frage über die Aufnahme und Ausscheidung des Eisens im Organismus. Inaugural-Dissert., Rostock 1905.
18. Hueck, Eisenreaktion im Knochengewebe. Zentralbl. f. Pathologie 1908.
19. Jacobj, Über die Eisenausscheidung aus dem Tierkörper nach subcutaner u. intravenöser Infektion. Inaugural-Dissertation Straßburg 1887.
20. Kunkel, Zur Frage der Eisenresorption. Pflügers Archiv 50, 1 (1891).
21. Kunkel und Anselm, Blutbildung aus anorganischem Eisen. Ebenda 61, 595.
22. Lipski, Über die Ablagerung und Ausscheidung des Eisens aus dem tierischen Organismus. Arbeiten aus dem Dorpater pharmakol. Institut, Bd. IX.
23. Erich Meyer, Über die Resorption und Ausscheidung des Eisens. Asher Spiro, Ergebnisse der Physiologie, Bd. V, S. 698.
24. Neumann, Beiträge zur Kenntnis der pathologischen Pigmente. Virchows Archiv 111, 25 (1888).
25. Noesske, Vorkommen und Bedeutung von Eisen in verkalkten Geweben, insbesondere dem Knochen. Zentralblatt für allg. Pathologie 1909, Bd. XX, No. 2.
26. Pappenheim, Vergleichende Untersuchungen über die elementare Zusammensetzung des roten Knochenmarks, Bd. 157.
27. Perls, Nachweis von Eisenoxyd in verschiedenen Pigmenten. Virchows Archiv 39, 42 (1867).
28. Quincke, Über Siderosis. Deutsches Archiv für klin. Medizin 27. 194 und 25, 567.
29. Sattler, Über die Eisenresorption und Ausscheidung im Darmkanal von Hunden und Katzen. Inaugural-Dissertation Kiel 1904.
30. Schmiey, Über den Eisengehalt des Tierkörpers. Zeitschr. für physiol. Chemie 39, 215.
31. M. B. Schmidt, Über die Verwandtschaft der hämatogenen und autochthonen Pigmente und deren Stellung zum sog. Hämosiderin. Virchows Archiv, Bd. 115, 397.
32. Sumita, Masao, Zur Frage der Eisenreaktion kalkhaltiger Gewebe, insbesondere der Knochen, Virchows Archiv, Bd. 200.
33. Tartakowsky, Über die Eisenresorptionswege beim Kaninchen. Pflügers Archiv 100, 586.
34. Virchow, Die pathologischen Pigmente. Virchows Archiv 1, 379 (1847).
35. Wicklein, Untersuchungen über Pigmentgehalt der Milz bei verschiedenen physiologischen und pathologischen Zuständen. Virchows Archiv, Bd. 124.

Der Grund, warum die Frage nach dem Eisengehalt der Knochen der Wirbeltiere immer wieder zu neuen Arbeiten Veranlassung gibt, ist gegeben durch die sich widersprechenden Resultate der Untersuchungen und ebensowohl auch durch die von einigen Autoren (Schmorl, Gierke) dem Eisen zugewiesene histomechanische Bedeutung beim Prozeß der Knochenneubildung. Das Kapitel der Knochenneubildung und der Knochenmetaplasie, bei dessen Bearbeitung Nößke auf die Eisenfrage der Knochen, wie er in seiner Mitteilung über diesen Gegenstand berichtet, besonders aufmerksam wurde, ist für den Theoretiker wie den Praktiker von hoher Bedeutung. „Das Eisen, so sagen Schmorl und Gierke, stellt die Beize dar für die nachfolgende Kalkablagerung. Ohne vorangehende Eisenablagerung tritt die Kalkablagerung, die ein integrierender Bestandteil der Knochenneubildung ist, nicht ein.“ Es wurde auch bald der nahe liegende Schluß gezogen, daß das Krankheitsbild der Rachitis, mit ihrem wesentlichsten pathologisch-anatomischen Merkmal der mangelnden Kalkablagerung in einer Störung des kindlichen Eisenstoffwechsels ihre Erklärung finde, und folglich der gestörte Eisenstoffwechsel das Moment sei, an dem eine rationelle Therapie der Rachitis einzusetzen habe. Schmorls Worte sind: Man wird künftighin bei Stoffwechseluntersuchungen, die man bei Rachitis vornimmt, nicht bloß den Kalk-, sondern auch den Eisenstoffwechsel in Betracht zu ziehen haben.

Dem gegenüber stehen die Arbeiten von Nößke und Hueck. Sie lehnen die Auffassung von der histomechanischen Bedeutung des Eisens ab, da sie bei ihren Untersuchungen am frisch untersuchten Knochenmaterial noch im Wachstum begriffener Individuen Eisen — besonders an der Stelle der ausgiebigsten Knochenneubildung, das ist an der Epiphysenlinie der Röhrenknochen — nie nachweisen konnten.

Die Differenz der Befunde ist nicht zum geringsten der angewendeten Technik zur Last zu legen. Stellt man sie bei der Bewertung der Untersuchungsergebnisse an die Spitze, so lassen sich zwei Perioden in der Historie dieser Knocheneisenarbeiten unterscheiden.

Die erste umfaßt sämtliche Arbeiten, die vor den Veröffentlichungen Huecks und Nößkes aus den Jahren 1908 und 1909 liegen; die zweite Periode beginnt mit den Arbeiten der genannten beiden Autoren, welche die Technik der Untersuchung ganz besonders berücksichtigen und zuerst in ausführlicherer Weise angeben.

Stellt auch schon Gierke die Forderung auf, daß man möglichst frisches Material untersuchen und ohne eisenhaltige Instrumente behandeln muß, so gehen Hueck und Nößke in ihren Forderungen weiter.

Sie verlangen für die Untersuchungen nur unbedingt frisches Materiel, das auch wirklich frisch untersucht wird, d. h. ohne vorherige Fixierung in Formalin und Alkohol usw. Sie verlangen vom Formalin und Wasser und so von allen angewendeten Flüssigkeiten, daß sie garantiert eisenfrei sind. Die Aufbewahrung des Materials hat in garantiert eisenfreien Gläsern (Jenenser Gläsern) zu geschehen.

Die auf die Nößke-Hueckschen Arbeiten folgenden Untersuchungen von Sumita und Olga Eliascheff berück-

sichtigen genau diese technischen Angaben. Gleichwohl sind die Resultate der Arbeiten der zweiten Periode widersprechend, während die Arbeiten der ersten Periode größere Einheitlichkeit zeigen.

Zuerst beschäftigte sich in ausführlicherer Weise mit der Eisenfrage der Knochen und Gewebe überhaupt Robert Schneider in einer Reihe von Arbeiten, die im Laufe der Jahre 1885—1895 erschienen sind. Er berücksichtigt ähnlich, wie später Baldoni, die einzelligen Lebewesen und Evertebraten, die in dieser Arbeit in den Kreis der Untersuchungen nicht hineinbezogen wurden.

Schneider fand eine große Verbreitung des Eisens in den Geweben und Organen des tierischen Organismus, und zwar in fast allen Bindesubstanzen. Dabei weist er dem Eisen ähnlich wie dem Kalk eine histomechanische Bedeutung zu. Er macht aufmerksam auf das manchmal beobachte Zusammentreffen von Kalk und Eisen, sowie auf einen gewissen Ersatz des Kalkes durch Eisen.

Gierke wies an verschiedenen physiologischen und pathologischen verkalkten Organen und Geweben mikroskopischen Eisengehalt nach, so am ganzen Skelettsystem der Embryonen und Neugeborenen von Mensch, Katze, Kaninchen und weißen Mäusen, so weit Verkalkung eingetreten ist. Ferner erweist sich bei Menschen ein großer Teil der physiologischen und pathologischen verkalkten Gewebe als eisenhaltig, während sich an anderen pathologischen Geweben kein Eisengehalt nachweisen läßt. Die Eisenverhältnisse der Knochen im extrauterinen Leben konnte Gierke auf Grund seiner Untersuchungen nicht mit Sicherheit entscheiden.

Aschoff bestätigte dann die Befunde Gierkes.

Schmorl (1904) konstatierte, daß am fertig ausgebildeten

Knochengewebe eine Eisenreaktion nicht zu erzielen ist, daß aber überall da, wo eine Neubildung von kalkhaltigem Knochengewebe stattfindet, die jüngsten Knochenteile eine deutliche, wenn auch verschieden starke Eisenreaktion geben. So wies Schmorl Eisen nach am jungen Callus, am Schwangerschaftsosteophyten, am neugebildeten Knochengewebe, bei Knochentumoren und bei heilender Rachitis.

Das manchmal beobachtete Zusammentreffen von Kalk und Eisen wurde bewiesen durch weitere Untersuchungen von Kockel (Kalkinkrustation des Lugengewebes), Rona (Eisenablagerung an den elastischen Fasern der Riesenzellen), Askanazy (Eisenbefund an einer Kalkmetastase), Best (Eisen bei intraokularer Knochenbildung), Hoffmann (Eisen an Rippenknochen von an Barlowscher Krankheit Gestorbenen).

Hueck findet, daß das frisch untersuchte Knochensystem sowohl von Foeten als auch von Erwachsenen und ebenso auch die üblichen pathologischen Kalkablagerungen nur Kalk und kein Eisen durch unsere mikrochemischen Methoden nachweisen lassen, und daß ein zwingender Beweis für den Eisengehalt solcher verkalkten Gewebe noch nicht erbracht ist.

Er ist der Meinung, daß das Zusammentreffen von Eisen und Kalk ein Kunstprodukt sei, hervorgerufen durch die Anwendung von eisenhaltigen Flüssigkeiten.

Auch Nößke kommt auf Grund seiner eingehenden Untersuchungen zu dem Resultat, daß das frisch untersuchte Knochenmaterial von noch nicht mazerierten Embryonen, wie Erwachsenen keine Eisenreaktion ergibt. Bei intrauterin abgestorbenen Früchten dagegen fand Nößke stark positive Eisenreaktion. Nößke fand ferner, ebenso wie Hueck, daß das Untersuchungsmaterial, welches bei frischer, der Fixierung unmittelbar voraufgegangener Untersuchung sich als absolut

eisenfrei erwies, nach der Fixierung und Härtung früher oder später eine deutliche Eisenreaktion gibt.

Während nun Hueck, wie oben erwähnt, der Ansicht zuneigt, die später auftretende Eisenreaktion sei bedingt durch Lösung von Eisen aus den Konservierungsflüssigkeiten und den verwendeten Gefäßen, vertritt Nößke vielmehr folgenden Standpunkt:

„Das Eisen diffundiert bei längerem Liegen der Knochen in Konservierungsflüssigkeiten aus eisenhaltigen Geweben der Umgebung in die Härtungsflüssigkeiten und wird sehr bald von dem Kalk, dank seiner Affinität zu Metallsalzen, absorbiert.

Vielleicht vermag das Formalin als solches durch eine besondere chemische Veränderung des organisch gebundenen Eisens im Blut dieses frei zu machen, was erklären würde, daß die in Formalin gehärteten Knochen und Kalkgewebe die intensivste Eisenreaktion geben."

Im Jahre 1910 erschien eine Arbeit aus dem Kaufmannschen Institut von Dr. Masao Sumita, betitelt: Zur Frage der Eisenreaktion kalkhaltiger Gewebe.

Sumita berücksichtigt die technischen Angaben Huecks und Nößkes.

Er faßt seine Resultate in folgenden Sätzen zusammen:

„Durch einwandfreie Methode kann man am einwandsfreien Material an embryonalen und neugeborenen Knochen und an pathologischen Knochenneubildungen sicheren Eisengehalt nachweisen.

Der Eisenbefund der Knochengewebe von größeren Kindern, Erwachsenen und an alten Knochenpartieen des pathologischen Knochenneubildungsprozesses ist fast konstant negativ.

Das Eisenbild der embryonalen und neugeborenen Knochen ist am stärksten an den jüngsten Knochenpartieen, am schwächsten

an den ältesten Knochenpartieen, oder die Eisenreaktion ist häufig nur an der jüngsten Knochenpartie nachweisbar.

Genauere Übereinstimmung von Eisen- und Kalkbildern ist fast niemals zu sehen. Sehr häufig zeigen sie ein ganz umgekehrtes Verhältnis; an der kalkärmsten, also an der jüngsten Knochenpartie ist die Eisenreaktion am deutlichsten, an der kalkreichsten, also an der ältesten Knochenpartie, ist sie am schwächsten nachweisbar.

Sehr häufig kann man sogar das Eisen an den direkt vor der Kalkablagerung stehenden Stellen nachweisen.

Im allgemeinen geht das Eisen dem Kalk voraus.

Das Eisenbild am Knochen zeigt fast immer diffusen Charakter, während die Kalkablagerung an beginnender Verkalkungsstelle immer feinkörnig nachzuweisen ist.

Das Eisenbild der wachsenden Knochen zeigt im Vergleich mit imbibiertem Eisengehalt der in eisenhaltigen Flüssigkeiten konservierten Knochen sehr häufig ganz umgekehrte Verhältnisse.“

Im Jahre 1911 ließ dann Olga Eliascheff eine Arbeit erscheinen mit dem Titel:

Gibt es eine Eisenreaktion verkalkter Gewebe?

Sie kommt zu folgendem Schluß: „Es gibt eine Eisenreaktion verkalkter Gewebe.

Es besteht keine Parallelität zwischen Kalkablagerung und Eisenablagerung. Der Eisengehalt verkalkter Gewebe ist kein Kunstprodukt, sondern vielmehr ein häufiges Ereignis im lebenden Organismus.

Der Eisengehalt ist nicht eine einfache Imbibition des Kalkes mit Eisensalzen, sondern es scheint eisengierige und kalkgierige Grundsubstanzen zu geben, die getrennt, oder vereint vorkommen, und entweder eins oder beide Salze absorbieren.

Die Eisenreaktion ist nach der Species ganz verschieden.

Während die Knochen von Kaninchenföten stark eisenhaltig sind, lassen solche von Meerschweinchenföten Eisen vermissen.

Menschenföten haben eisenfreie Knochen. Nach intrauteriner Maceration kann starke Eisenreaktion entstehen. Bei der pathologischen Kalkablagerung ist das darin enthaltene Eisen mehrfach einwandfrei als schon im Leben vorhanden nachgewiesen."

Angesichts der Tatsache dieser sich so schroff gegenüberstehenden Untersuchungsergebnisse, von denen die einen dem Eisen eine histomechanische Bedeutung bei der Knochenbildung zusprechen, andere den Befund einer positiven oder negativen Reaktion am Knochen von der jeweils untersuchten Spezies abhängig machen, schien es durchaus notwendig, die Frage nach der Eisenreaktion der Knochen einer erneuten Prüfung zu unterziehen.

Es muß auch hier eine detaillierte Darstellung der Untersuchungstechnik, da sie, wie erwähnt, von maßgebender Bedeutung für die Befunde ist, geliefert werden.

Wir machten uns zunächst zur Aufgabe, die Sumitaschen Resultate nachzuprüfen. Das konnte natürlich nur geschehen bei genauer Berücksichtigung der von ihm selbst in seiner Arbeit angebenen Technik.

Die Sumitaschen Vorschriften beziehen sich

1. Auf Auswahl und Vorbereitung des Materials zum Eisennachweis.

2. Auf die mit dem Material zum Eisennachweis anzustellenden Reaktionen. Was Sumita hierüber sagt, ist in Folgendem kurz zusammengefaßt:

Man muß möglichst frisches Material (womöglich an lebend frischen Präparaten) ohne irgend eine Vorbehandlung in differenten Flüssigkeiten untersuchen, denn schon lange Zeit in differenten Flüssigkeiten aufbewahrte Präparate zeigen sehr häufig ganz andere Eisenverhältnisse als die der frischen Untersuchung.

Sumita wendet ferner die Kochgefriermethode an.

Ein Organstück wird wenige Minuten lang in kochendes, absolut eisenfreies Wasser gelegt, dann wird es nach kalter Abspülung am Gefriertisch geschnitten, und, ohne zu lange im Wasser zu liegen, untersucht.

Einiges Material wird nach kurzer (6 bis 12 Stunden) Fixation in 4 bis 5% absolut eisenfreier Formalinlösung am Gefriertisch geschnitten.

Die für Gefrierschnitte fast unbrauchbaren, zarten Embryonen werden möglichst schnell in aufsteigender Alkoholhärtung, Chloroform, Paraffin eingebettet und geschnitten.

Bei den Knochen von Erwachsenen, für welche die übliche Methode der Schnittherstellung auf dem Gefriermikrotom versagt, wandte Sumita statt Zupf- oder abgebrochenen Knochenbalkenpräparaten nachstehende Methode an:

Er legte das einige Millimeter dicke Knochenstück auf den Kohlensäure-Gefriertisch, und nach vollstem Gefrieren konnte er leicht eine mikroskopisch, für schwache Vergrößerung anwendbare dünne Scheibe durch sägenden Zug mit dem starken Skalpell bekommen.

Formol, Salzsäure, Alkohol, Chloroform, Farblösungen müssen eisenfrei sein.

Zum Nachweis des Eisens der Flüssigkeiten wird die Rhodankaliumprobe benutzt, wobei wichtig ist, daß man überschüssiges Reagenz zu der vorhandenen Eisenmenge hinzugießt.

Das vom Messer stammende Eisen läßt sich an seiner Unregelmässigkeit des Auftretens erkennen.

Für den Eisennachweis empfiehlt sich am meisten die Berliner Blaureaktion, denn aus einer von Neumann angegebenen Tabelle der Empfindlichkeitsgrenze für Metalle bei Reaktionen kann man ersehen, daß die Empfindlichkeit des Ferrorzyankaliums in Reagenzgläsern an Eisenoxyd mindestens 250 mal so empfindlich ist als die des Schwefelammon. Da nach Autenrieht das gelbe Blutaugensalz keineswegs gegen verdünnte und schwache Säuren beständig ist, sondern leicht durch die schwächsten Säuren unter Bildung von Blausäure ein partielle Zersetzung erleiden kann, so hat die Anstellung der Berliner Blaureaktion in ganz bestimmter Weise zu erfolgen.

Die Schnitte werden in kaltgesättigter Ferrorzyankaliumlösung 1 bis $1^1/_2$ Stunden bei Brutofentemperatur belassen. Dann werden sie kurz in Wasser ausgewaschen und darauf für wenige Minuten eingelegt in stark verdünnte Salzsäurelösung (2 bis 3 guttae Salzsäure pro. 20 ccm H_2 O. Das Ferrozyankalium muß in sicher garantiert eisenfreiem Wasser gelöst werden, und das angewendete Reagenz muß jedesmal nach dem Gebrauch erneuert werden. Jeder Schnitt muß in einem besonderen Gefäß in den Brutofen gebracht werden. In der Glasflasche aufbewahrte Ferrorzyankaliumlösung darf man nicht zu lange stehen lassen, es ist besonders wichtig, von Zeit zu Zeit auf die Farbe der Lösung zu achten (leicht bläuliche Veränderung der Farbe ist ein Zeichen von Blausäureabspaltung). Eine Stunde lange Einwirkung des Reagenz in Brutofentemperatur ist bekanntlich viel sicherer und einfacher zur Erzielung der Wirkung als das 24 Stunden lange Stehenlassen bei Zimmertemperatur. Die Ferrorzyankalium

lösung ohne Säurezusatz in dieser Temperatur ist natürlich unzersetzlich, aber bei Berücksichtigung der Angabe Autenriets, daß er in der Ferrorzyankaliumlösung, der Pepton zugesetzt war, bei langem Stehenlassen in Körpertemperatur geringe positive Reaktion von Berliner-Blau nachgewiesen hat, muß man doch sehr vorsichtig sein, die Ferrorzyankaliumlösung bei Brutofentemperatur in Gegenwart der eiweißhaltigen Gewebsstücke zu lange stehen zu lassen. Aus diesem Grunde ist eine jedesmalige Erneuerung des Reagens und die Benutzung besonderer Gefäße für jeden Schnitt sehr wichtig. So in Ferrorzyankalium behandelte Schnitte werden in eisenfreiem Wasser nur kurze Zeit ausgespült und dann in ganz schwach mit sicher eisenfreier Säure angesäuertes eisenfreies Aqua destillat gebracht.

Bei der makroskopischen Schwefel-Ammonprobe kann das Schwarzwerden der makroskopischen Knochenpräparate durch Knochenmarksreaktion bedingt sein. Deshalb muß auch die mikroskopische Schwefel-Ammonprobe angewendet werden.

Als Kontrollpräparate verwendet Sumita

1. Gewöhnliche Hämatoxylin-Eosin Präparate.

2. Kalkreaktionspräparate nach Kossa. Die Schnitte werden in 5% argent. Nitric. Lösung in hellem Tageslicht belassen und dann in Wasser ausgewaschen; man kann eventuell Kernfärbung mit Alaun- oder Lithion-Karmin anschließen.

3. Schwefel-Ammon-Präparate.

4. Oxalsäure-Präparate. Die Oxalsäure löst das Eisen, nicht den Kalk. ad. 4) Die Schnitte werden in halb mit aqua destillata verdünnter Oxalsäurelösung eine Stunde bei Brutofentemperatur belassen. Dann werden sie gründlich ausgewaschen in reichlichem, eisenfreiem Wasser. Darauf werden die Schnitte weiter streng parallel mit den andern in Ferro-

zyankaliumlösung behandelt. Soweit die technischen Angaben Sumitas.

Durch mehrfache Versuche vergleichender Art konnten wir feststellen, daß diese Sumitaschen Anweisungen für die Anstellung einer einwandsfreien Eisenreaktion sehr wohl brauchbar sind.

Rein vom theoretischen Standpunkt aus konnte man zunächst Einwände erheben gegen die von Sumita angewendete Kochgefriermethode. Es mußte bei objektiver Beurteilung der Eisenfrage der Knochen die Möglichkeit einer postmortalen Imbibition dadurch, daß aus den irgendwie veränderten organischen Eisenverbindungen des im Knochen enthaltenen Blutes mikrochemisch nachweisbares Eisen frei wird, durchaus ernstlich erwogen werden. Die Frage nun, wie aus dem organischen Eisenverbindungen des Blutes organisches Eisen abgespalten werden kann, ist zu kompliziert und zur Zeit selbst von physiologischer und chemischer Seite so wenig aufgeklärt, daß der Einwand, es könne durch einfaches Kochen des Materials Eisen frei werden, respektive in chemich locker gebundene Formen übergeführt werden, zu recht besteht. Die Untersuchungen haben aber ergeben, daß die Anwendung der Kochgefriermethode keinen Unterschied im Ausfall der Reaktion bedingt gegenüber dem Ausfall bei einfach frischer Untersuchung.

Skeptisch mußte man ferner sein gegenüber dem Vorschlag Sumitas die mikroskopischen Schnitte in der Ferrozyankaliumlösung bei Brutofentemperatur 1 bis 1½ Stunden zu belassen. Sumita erwähnt selbst, die Angaben Autenrieths, daß bei Gegenwart von Pepton resp. eiweißhaltiger Substanz bei Körpertemperatur eine Zersetzung des Ferrozyankaliums eintreten kann. Er glaubt aber dieser Gefahr zu entgehen,

indem er vorschreibt, die Schnitte nur kurze Zeit in der Lösung zu lassen, und indem er ferner jedesmalige Erneuerung des Reagens und die Benutzung besonderer Gefäße für jeden Schnitt als unbedingt erforderlich hinstellt. Auch hier haben die von uns angestellten Versuche ergeben, daß das Belassen der Schnitte in der Ferrorzyankaliumlösung bei Brutofentemperatur keine Veränderungen in der Reaktion gegenüber der Reaktion des frisch untersuchten Materials zu Folge hat.

Gleichwohl ist unserer Ansicht nach die einwandfreieste Reaktion die, welche sofort eintritt. Es wird also der Schnitt in Ferrozyankaliumlösung gelegt und hierzu werden mehrere ccm einer 2 bis 4% Salzsäure hinzugefügt. Die Reaktion soll dann spätestens nach 5 bis 7 Minuten eingetreten sein.

Genau nach den oben geschilderten Vorschriften Sumitas verfuhren wir bei der von uns angestellten Nachprüfung der Befunde der Eisenreaktion im Knochen.

Unser Untersuchungsmaterial bezog sich zuerst in allererster Linie auf den Eisengehalt der Knochen von Embryonen. Denn gerade die Untersuchung der physiologischen wie auch pathologischen Knochenneubildungsprozesse hatte zu den widersprechendsten Resultaten geführt, während ja alle Autoren darin einig sind, daß an frisch untersuchten, nicht pathologisch veränderten Knochen erwachsener Individuen mit den microchemischen Methoden eine Eisenreaktion nicht zu erzielen ist.

Es wurden untersucht von menschlichen Foeten:

1. Ein menschlicher Foet von 5 cm Kopfsteißlänge, bei der Abortausräumung gewonnen, 2 Stunden später untersucht.

2. Ein menschlicher Foet von 9½ cm Kopfsteißlänge, spontan ausgestoßen, nach 4 Stunden untersucht.

3. Ein menschlicher Foet von 14 cm Kopfsteißlänge, der Frauenklinik ohne genauere Angaben von außerhalb zugeschickt.

4. Ein menschlicher Foet von 17¾ cm Kopfsteißlänge, eine Stunde nach der spontanen Ausstoßung untersucht.

5. Ein menschlicher Foet von 30 cm Kopfsteißlänge, spontaner Abort, sichere Zeichen von Lues in Form der visceralen Lues und der Osteochondritis luetica.

6. Ein menschlicher Foet von 26½ cm Kopfsteißlänge, spontaner Abort, starke Macerationserscheinung des Foeten, diffuse Rötlichfärbung der Haut durch Hämolyse.

Es wurde bei diesen Embryonen die Eisenreaktion jedesmal an folgenden Knochen angestellt.

1. An den Rippen.
2. An den Wirbeln.
3. Am Oberschenkelknochen.
4. An den Unterschenkelknochen.
5. Am Oberarmknochen.
6. An den Unterarmknochen.
7. Am Calcaneus.
8. An den Schädelknochen.

Die Eisenreaktionen und die entsprechenden Kontrollreaktionen wurden in folgender Anordnung ausgeführt.

1. Berliner-Blaureaktion macroskopisch und microskopisch.
2. Schwefel-Ammon-Reaktion macroskopisch und microskopisch.
3. Kalkreaktion nach Kossa macroskopisch und microskopisch.
4. Oxalsäure-Berliner-Blaureaktion macroskopisch und microskopisch.

In den Fällen 1 bis 4 wurden die Eisenreaktionen an sämtlichen Knochen negativ gefunden. In den Fällen 5 und 6 wurden sie dagegen positiv gefunden und zwar an sämtlichen untersuchten Knochen, mit Ausnahme der Wirbel von Fall 6.

Beim Vergleich der Eisenbefunde dieser 6 menschlichen Embryonen liegt es nahe anzunehmen, wie auch bereits von Hueck und Noeßke ausgesprochen wurde, daß für das Eintreten der Eisenreaktion der Macerationsprozeß, der in Fall 5 und 6 tatsächlich vorlag, von Bedeutung ist.

In welcher Weise man sich die Wirkung des Macerationsprozesses vorzustellen hat, davon soll hier noch nicht die Rede sein. Die später zu besprechenden, zur Klärung dieser Frage angestellten Versuche werden noch Gelegenheit geben, auf diesen Punkt zurückzukommen.

Von Hundeembryonen wurden untersucht:

2 Hundefoeten von 10 cm Kopfsteißlänge, beide durch Laparotomie gewonnen und sofort untersucht.

Die Eisenreaktion fiel an den untersuchten Rippen, Wirbeln, Femur, Tibia, Humerus, Ulna, Radius und Schädelknochen negativ aus.

Die Eisenreaktionen an den entsprechenden Knochen von 3 durch Laparatomie gewonnenen und sofort zur Untersuchung gelangten Kaninchenfoeten waren negativ.

Von Meerschweinchenfoeten wurden 4 durch Laparotomie gewonnene untersucht. Die Anstellung der Eisenreaktionen erfolgte sofort nach Befreiung der Knochen von den umgebenden Weichteilen.

Der Eisenbefund war auch hier an den untersuchten Rippen, Wirbeln, Femur, Tibia, Humerus, Radius, Ulna und Schädelknochen ein negativer.

Ebenfalls negativ war der Eisenbefund an den 4 durch Laparotomie gewonnenen und wiederum sogleich zu Untersuchung gelangten Mäuseembryonen.

Sodann war es unsere Aufgabe die Eisenreaktion am Knochensystem von Neugeborenen der Säugetierreihe nachzuprüfen.

Von menschlichen Neugeborenen gelangten 3 Fälle zur Untersuchung. Es wurden hierbei in sämtlichen Fällen die Rippen, Wirbel, Ober- und Unterschenkelknochen, Oberarm- und Unterarmknochen, Calcaneus und Schädelknochen untersucht.

1. Ein intra partum abgestorbenes Kind.
   Eisenbefund negativ.
2. Ein 3 Tage alter menschlicher Neugeborener.
   Eisenbefund negativ.
3. Ein 2 Tage nach der Totgeburt untersuchter, menschlicher Neugeborener mit sicheren Zeichen von Lues congenita.
   Eisenbefund positiv.

Weiter wurden untersucht von Neugeborenen

4 Hunde desselben Wurfes, von denen 3 an den ersten, 3 auf die Geburt folgenden Tagen getötet und jedesmal sofort untersucht werden, während der 4. Hund erst am 7. Tage nach der Geburt getötet und untersucht wird. Bei den Hunden 1 bis 3 ist die Eisenreaktion an den untersuchten Knochen, nämlich Wirbel, Femur, Tibia, Humerus, Radius, Fußwurzelknochen und Schädelknochen, negativ.

Auch Hund 4 zeigt negative Reaktion an allen übrigen Knochen, während er an den Rippen positiven Befund zeigt.

Wie der positive Ausfall der Eisenreaktion an den Rippen in diesem letzteren Falle zu erklären ist, läßt sich nicht einwandfrei feststellen. Jedenfalls stehen auch hier der Annahme keine Schwierigkeiten im Wege, daß es sich um die Wirkung eines eben beginnenden Macerationsprozesses handeln kann, zumal in diesem Fall 4 Stunden bis zur Untersuchung der Rippen, von der Tötung ab gerechnet, verstrichen waren.

2 zwei Tage alte Kaninchen, die durch Narkose getötet und sofort untersucht werden, ergeben negativen Eisenbefund.

Ebenfalls negativen Eisenbefund zeigen junge Meerschweinchen, die ca. 5 Stunden post partum getötet und sofort untersucht werden.

Desgleichen ergeben neugeborene Mäuse an den bei ihnen untersuchten Knochen negativen Eisenbefund.

Eine weitere Aufgabe, die uns gestellt war, bestand in der Nachprüfung des Auftretens der Eisenreaktion am Knochensystem von erwachsenen Individuen.

Am besten konnte die Prüfung vorgenommen werden an den erwachsenen Kaninchen, Meerschweinchen und Mäusen. Denn hier war das zu untersuchende Material einwandfrei frisch zu beschaffen, und die technischen Schwierigkeiten beim Anfertigen von microskopisch verwendbaren Schnitten waren nicht so groß wie z. B. bei dem Knochenmaterial von erwachsenen Menschen.

Die Prüfung ergab beim erwachsenen Meerschweinchen sowohl, wie beim erwachsenen Kaninchen und der erwachsenen Maus stets negativen Eisenbefund. Es wurden bei diesen drei Gattungen stets die Rippen, die Wirbel, das Femur, die Tibia, Humerus, Fußwurzelknochen und Schädelknochen untersucht. Die Befunde am Knochenmaterial menschlicher Erwachsenen waren zumeist negativ, jedoch nicht ganz einheitlich negativ, es waren auch mehrere positive Eisenbefunde darunter. Der positive Ausfall läßt sich zumeist darauf beziehen, daß das entsprechende von uns geprüfte Knochenmaterial der erwachsenen Menschen nicht genügend frisch zur Untersuchung gelangte.

Eine weitere Gruppe von Untersuchungen hatte sich zu befassen mit dem Nachweis des späteren Eintretens der Eisen-

reaktion an den bei frischer Untersuchung negatives Resultat ergebenden Knochen, nachdem sie durch Konservierung mittels verschiedener Methoden oder, allein dem Fäulnisprozeß überlassen, Veränderungen durchgemacht hatten. Noeßke hatte beobachtet, daß gerade die in Formalin gehärteten Knochen besonders starke Eisenreaktion nach verhältnismäßig kurzer Zeit ergaben.

Er spricht auf Grund dieses Befundes in der citierten Arbeit die Vermutung aus, daß das Formalin als solches durch eine besondere chemische Veränderung des organisch gebundenen Eisens im Blut dieses freizumachen imstande sei.

In einer größeren Versuchsanordnung wurde Knochenmaterial von menschlichen Embryonen, menschlichen Neugeborenen und menschlichen Erwachsenen, ferner Knochenmaterial derselben Alterstufen von Kaninchen, Meerschweinchen und Mäusen

1. in Formalin gelegt,
2. in Formalindampf aufgehängt,
3. in steigenden Alkohol gelegt,
4. gekocht und steril aufbewahrt,
5. in faulendes Blut gelegt.

Bei Anstellung der Reaktion an Knochen von erwachsenen Individuen wurde noch folgende Maßregel getroffen. Es war die Möglichkeit zu erwägen, ob nicht der relativ große Fettgehalt der Knochen eines erwachsenen Individiums das Eintreten der Reaktion störe. Um solchem Einwand von vornherein gegenüber zu treten, wurden die Knochen durch Ätherbehandlung von ihrem Fett befreit. Das Ergebnis bei sämtlichen Versuchen war, daß überall positive Berliner-Blau- und Schwefel-Ammonreaktion eintrat, wenn auch nach ganz verschiedenen Zeitabschnitten. Es ließ sich auch in unseren

Versuchen bestätigen, daß zumeist bei vorangegangener Formalinhärtung die Eisenreaktion schneller eintrat als bei nur in Alkohol eingelegten Präparaten. In einem Fall eines in steigenden Alkohol eingelegten Embryos blieb die Eisenreaktion negativ, während sie bei Konservierung in Formalin positiv ausfiel.

Noch längere Zeit bis zum Eintreten der Reaktion verstrich bei dem nur dem Formalindampf ausgesetzten Material, aber die Reaktion trat — und das ist ganz besonders zu betonen — schließlich eben doch ein.

Der Ausfall der Eisenreaktion, der sich bei den in faulendes Blut gelegten Knochen zeigte, ist nicht gleichzusetzen dem Ausfall der Reaktion bei dem in Formalin usw. eingelegten Material. Es war stets im Gegensatz zur Reaktion am Formalinmaterial eine mehr diffuse und viel schwächere Reaktion, die gewöhnlich schon in kürzerer Zeit eintrat, aber auch im Laufe der Zeit nicht wesentlich stärker wurde. Eine exquisite Blaufärbung der Epiphysenlinie wurde hierbei nicht beobachtet.

Ein besonderes Verhalten zeigte die Eisenreaktion des Knochenmaterials, das gekocht und steril aufbewahrt wurde. Die Eisenreaktion war eine diffuse, besonders das Periost befallende, auch die Knorpelknochengrenze war bisweilen diffus gefärbt.

Zur Veranschaulichung der Zeitdauer, die bis zum Eintritt der Eisenreaktion bei den verschiedenen, oben erwähnten Methoden der Vorbehandlung des Knochenmaterials verstreicht, will ich drei Beispiele herausgreifen, und zwar

1. Die Ergebnisse der Untersuchung bei einem menschlichen Embryo.

2. Die Ergebnisse der Untersuchug bei einem neugeborenen Meerschweinchen.

3. Die Ergebnisse der Untersuchung bei einer erwachsenen Maus.

Die Beispiele sind aus den vorliegenden Versuchsreihen ganz willkürlich herausgegriffen, und sie repräsentieren nur das, was auch in den übrigen angestellten Versuchen gefunden wurde.

Die Eisenreaktion am Knochen eines menschlichen Embryro war positiv.

Nach 3 Wochen bei Konservierung in Formalin,
„ 5 Wochen bei Konservierung in Formalindampf,
„ 5 Wochen bei Konservierung in steigendem Alkohol,
„ 4 Wochen bei steriler Aufbewahrung nach Kochen,
„ 2 Wochen bei Einlegen in faulendes Blut.

Die Eisenreaktion am Knochen eines neugeborenen Meerschweinchen war positiv.

Nach 12 Tagen bei Konservierung in Formalin,
„ 3 Wochen bei Konservierung in Formalindampf,
„ 3 Wochen bei Konservierung in steigendem Alkohol,
„ 2 Wochen bei steriler Aufbewahrung nach Kochen,
„ 14 Tagen bei Einlegen in faulendes Blut.

Die Eisenreaktion war positiv am Knochen einer erwachsenen Maus.

Nach 8 Tagen bei Konservierung in Formalin,
„ 12 Tagen bei Konservierung in Formalindampf,
„ 16 Tagen bei Konservierung in steigendem Alkohol,
„ 2 Wochen bei steriler Aufbewahrung nach Kochen,
„ 7 Tagen nach Einlegen in faulendes Blut.

Das Resultat der Nachuntersuchung der Eisenreaktion im Knochensystem von Embryonen, Neugeborenen und Erwachsenen der in dieser Arbeit untersuchten Specis von Verterbraten können wir in folgenden Sätzen zusammenfassen.

1. Im frisch untersuchten Knochenmaterial von Embryonen, Neugeborenen, Erwachsenen ist mit microchemischen Methoden Eisen nicht nachzuweisen.
2. Bereits fixiertes, sterilisiertes und steril aufbewahrtes, sowie dem bakteriellen Fäulnisprozeß überlassenes, bei frischer Untersuchung eisenfrei gefundenes Knochenmaterial von Embryonen, Neugeborenen, Erwachsenen ergibt nach verschieden langer Zeit eine positive microchemische Eisenreaktion.

Die Untersuchungen über den Eisengehalt der Knochen haben mich also zu demselben Ergebnis geführt, zu dem auch bereits Hueck und Nößke auf Grund ihrer eingehenden Untersuchungen gelangten.

Die Schlüsse, die ich aus meinen Befunden ziehe, entsprechen ebenfalls denen von Hueck und Noeßke.

1. Das Eisen hat beim Knochen - Neubildungsprozeß keinerlei histomechanische Bedeutung.
2. Die Eisenreaktion der Knochen ist als postmortaler Vorgang aufzufassen. Das dabei freiwerdende Eisen wird dank seiner Affinität zum Kalk an diesen gebunden.

Wie nun im Einzelnen dieser postmortale Vorgang sich zusammensetzt, welches die Bedingungen seines Eintretens sind, wurde zum Gegenstand der nachfolgenden Untersuchung. Ich will kurz die Untersuchungsreihen schildern, die wir zu diesem Zweck angestellt haben. Zu einem endgültigen Resultat sind wir freilich noch nicht gelangt, doch dürfte es vielleicht von Wert sein, anzugeben, in welche Richtung wir an Hand der Untersuchungen gelangt sind, und welche Vorstellung von dem postmortalen Vorgang beim Auftreten der Eisenreaktion uns augenblicklich am wahrscheinlichsten dünkt.

Wie bereits oben erwähnt, neigt Hueck zu der Ansicht, die später auftretende Eisenreaktion am fixierten Untersuchuugsmaterial sei bedingt durch Lösung von Eisen aus den Konservierungsflüssigkeiten und aus den Gefäßen. Da wir stets eisenfreie Flüssigkeiten verwendeten, — das Wasser, Formalin, der Alkohol wurden jedesmal doppelt destilliert — halten wir uns berechtigt, diese Auffassung der Lösung von Eisen aus den Konservierungsflüssigkeiten ablehnen zu können.

Vergleichende Versuche über den Eisengehalt von Knochen, die in garantiert eisenfreien Gläsern aufbewahrt wurden, und von Knochen, die wir in gewöhnlichen Gläsern aufbewahrten, lehrten uns, daß die, wenn überhaupt, so doch sicherlich nur in ganz geringen Spuren statthabende Lösung des Eisens aus den Gefäßen durch die Konservierungsflüssigkeiten nicht die Bedeutung hat, die ihr Hueck zuschreibt.

Es muß vielmehr zweifellos ein anderes Moment sein, welches die postmortale Imbibition der Knochen mit Eisen bedingt. Noeßke sprach die Idee aus, daß es sich um ein Freiwerden des mikrochemisch nachweisbaren Eisens aus dem organisch gebundenen Bluteisen durch chemische Umwandlungen infolge des Einwirkens der Konservierungsflüssigkeiten handeln könne.

Die nun folgende Versuche beschäftigten sich damit, daß im Knochenblut enthaltene Eisen in mikrochemisch nachweisbare Formen überzuführen. Es wurde ganz frisches Knochenmaterial sowohl, wie älteres, sowie auch bereits in Formalin konserviertes der Einwirkung verschiedener Reagenzin $^1/_2$ bis 6 Stunden lang vor der Anstellung der Eisenreaktionsprobe unterworfen. Die verwendeten Reagenzien waren: Liquor kalii caustici, acidum nitric. pur. und acidum hydrochlor. und Ameisensäure.

Die Ameisensäure wurde angewendet von der Überlegung ausgehend, daß sie vielleicht der wirksame Bestandteil des Formalins ist bei der dem Formalin supponierten Befähigung, das mikrochemisch nachweisbare Eisen aus organischer Bindung abzuspalten. Untersuchungsmaterial waren hauptsächlich die Röhrenknochen von Kaninchen, Mäusen, jungen Meerschweinchen und menschlichen Foeten.

Es ergibt sich aus den angestellten Versuchen: Die Vorbehandlung der Präparate mit den genannten Reagenzien vermag keine wesentliche Anderung der Reaktion gegenüber ihrem Ausfall am frischen, sofort untersuchten Material hervorzurufen.

Gibt das Material bei frischer Untersuchung negative Eisenreaktion, so bleibt sie negativ auch nach Behandlung mit den erwähnten Reagenzien. Gibt das Material bei frischer Untersuchung positive Reaktion, so bleibt sie auch positiv bei Einwirkung des liquor Kalii caustici. Bei Behandlung mit den Säuren hingegen tritt an Stelle der auf die Epiphysenlinie oder auf die Periostknochengrenze beschränkten Eisenreaktion eine ganz diffuse, Knochen, Knochenmark und eventuell auch die angrenzenden Weichteile befallende Eisenreaktion. Es handelt sich hierbei um eine Lösung des Eisens durch die angewendeten Säuren, wie das ja auch nach den analogen chemischen Vorgängen zu erwarten ist. Diese Versuche zeigen, daß die Einwirkung von Lauge und von Säuren nicht im Stande ist, das im Knochenblut organisch gebundene Eisen in mikrochemisch nachweisbare Form überzuführen.

Es wurde nun eine negative Beweisführung versucht. Ist das Knochenmark mit seinem Blutgehalt der Bestandteil, aus dem das Eisen durch Einwirkung von Konservierungsflüssigkeiten frei gemacht wird, so dürfte trotz Einlegen in

solche Flüssigkeit eine Eisenreaktion am Knochen nicht auftreten nach vorausgegangener Auslöffelung des Markes (mittels feiner Gasnadeln).

Die Knochen vom menschlichen Neugeborenen, von neugeborenen Meerschweinchen, von neugeborenen Kaninchen und von einer 6 Tage alten Maus, die frisch untersucht keinen Eisenbefund zeigten, ergaben, nachdem sie durch Auslöffelung vom Mark befreit waren und 2 bis 4 Wochen in Formalin fixiert waren, doch sämtlich positive Reaktion.

Zur Beantwortung der Frage, wie sich andere blutreiche Organe, frisch untersucht sowohl, wie nach Fixierung bez. des Eisengehaltes verhalten, wurden Leber und Milz vom Meerschweinchen und Kaninchen untersucht. Bei Untersuchung des frischen Materials war die Reaktion an Leber und Milz negativ. Eine Leber eines Meerschweinchens ergab positive Reaktion. Ob hier eine Erkrankung des Meerschweinchen vorlag, konnte nicht mehr festgestellt werden. Bei Untersuchung des fixierten Materials ergab sich in sämtlichen Fällen positive Eisenreaktion. Eine Meerschweinchenleber zeigte ein ganz besonderes Verhalten, sie ergab positive Reaktion in feinverzweigter Form im interlobulären Bindegewebe, der Gefäßverteilung folgend.

Von zufällig mir zu Gebote stehenden Lebern untersuchte ich noch im frischen Zustand folgende:

1. Leber eines mit haemolytischem Serum gespritzten Kaninchens Befund negativ.
2. Leber eines mit Pilocarpin gespritzten Meerschweinchens Befund negativ.
3. Eclampsieleber einer 36jährigen Frau Befund positiv.

4. Leber eines Falles von Pseudoleucaemie

Befund negativ.

Gegen die Anschauung, daß nach Auslöffelung des Markes eine positive Eisenreaktion am Knochen nicht mehr auftreten dürfte, läßt sich mit Recht einwenden, daß erstens die vollständige Auslöffelung des Markes technisch ungemein schwer ist und zweitens der Knochen außer den Markgefäßen noch andere Blutgefäße enthält.

Es ist soviel zusagen, mit Hilfe der geschilderten und angestellten Versuche läßt sich der Beweis nicht erbringen, daß das Eisen, mit dem sich der Knochen postmortal imbibiert, aus dem Knochenbluteisen stammt, und durch Einwirkung der Konservierungsflüssigkeiten aus ihm abgespalten wird.

Die darauf von mir angestellten Versuche aus reinem, frischem Blut durch Einwirkung verschiedenster Reagenzien eine Abspaltung von Eisen, das sich mit dem Berliner-Blau-Salzsäure-Gemisch oder mit Schwefelammon nachweisen läßt, zu erzielen, führten ebenfalls zu keinem positiven Resultat.

Die für diese Versuche der Abspaltung von Eisen aus frischem Blut (benutzt wurde Schweineblut) verwendeten Reagenzien waren einmal Säuren verschiedenster Koncentration, sowie Laugen; ferner wiederum die Konservierungsmittel der mikroskopischen Technik, nämlich Formalin und Alkohol differenten Prozentgehaltes. Der eventuelle Einfluß der Ameisensäure auf die zu prüfende Eisenabspaltung wurde wie in den vorher gehenden Versuchen auch hierbei verfolgt.

Die Versuche wurden in folgender Weise angestellt. Es wurden die mit 1 bis 12 bezeichneten Reagenzgläser beschickt, wie nachstehend angegeben.

R. I. . . . 1 ccm Blut + 5 ccm 10% H. Cl.
R. II. . . . 1 „ „ + 5 „ 100% „ „

R. III. . . .	1 ccm	Blut	+ 5 ccm	1%	H. Cl.
R. IV. . . .	1 „	„	+ 5 „	1%	HNO_3
R. V. . . .	1 „	„	+ 5 „	100%	HNO_3
R. VI. . . .	1 „	„	+ 5 „	10%	H_2SO_4
R. VII. . . .	1 „	„	+ 5 „	100%	H_2SO_4
R. VIII. . . .	1 „	„	+ 5 „	4%	Formalin
R. IX. . . .	1 „	„	+ 5 „	40%	„
R. X. . . .	1 „	„	+ 5 „	96%	Alkohol
R. XI. . . .	1 „	„	+ 5 „	—	Alkoh. absol.
R. XII. . . .	1 „	„	+ 5 „	—	Ather pur.

Die so beschickten 12 Reagenzgläser wurden drei Tage am lichtgeschützten Ort stehengelassen, dann wurde ihr Inhalt zentrifugiert, die überstehende Flüssigkeit wird abgehebert und an ihr die Eisenprobe angestellt:

1. Mit dem Ferrozyankalium-Salzsäure-Gemisch.
2. Mit Schwefelammon.

Bei keiner der beiden angestellten Eisenreaktionen tritt der zu erwartende Farbenumschlag ein, d. h. bei der Ferrozyankaliumprobe die Blaufärbung, bei der Schwefelammonprobe die Schwarzfärbung.

Der Inhalt eines jeden Röhrchens wird jetzt, nachdem also bereits zur Anstellung der Eisenreaktionen Ferrozyankalium-Salzsäure resp. Schwefelammon hinzugetan ist, einem kurzen Aufkochen unterworfen. Die Farbenveränderuug der Flüssigkeit wird notiert und mit dem vorher vorhandenen Farbenton verglichen. Es zeigte sich nun bei Anstellung der Berliner-Blaureaktion eine Blaufärbung des Reagenzglases R. VI (bei ihm war zum Blut 10% H_2SO_4 gesetzt). Es fehlte aber an der entsprechenden, der Schwefelammonreaktion unterworfenen Probe der Umschlag in Schwarzfärbung völlig.

Es muß jedoch verlangt werden, daß beide Reaktionen

positiv ausfallen, wenn in der Tat anorganisches Eisen abgespaltet worden ist. Das Auftreten der Blaufärbung in Röhrchen VI kann nicht als Eisenreaktion gelten, sondern muß vielmehr bezogen werden auf eine Zersetzung des Ferrozyankaliums, wie sie von Autenrieth bei Gegenwart eiweißhaltiger Substanzen und unter Erwärmung bereits beobachtet wurde.

In einer zweiten Versuchsordnung wird je 1 ccm Blut (Schweineblut) versetzt

a) mit 100 ccm 4% Formalin,
b) „ 50 „ — Ameisensäure,
c) „ 50 „ — Kalilauge,
d) „ 50 „ — Alkohol absolut,
e) „ 50 „ 48% Alkohol,
f) „ 50 „ $^1/_2$% H. Cl.

Jede Mischung wird eine $^1/_2$ Stunde lang gekocht, dann zentrifugiert, die überstehende Flüssigkeit wird abgehebert und auf dem Wasserbade eingedampft. Das Eingedampfte wird mit destilliertem Wasser aufgenommen und in ein Reagenzglas übergefüllt. Hieran werden die Eisenreaktionen angestellt. Bei der Berliner-Blaumethode tritt in der Kälte nirgends Blaufärbung auf — erst nach Aufkochen des Inhaltes des Reagenzglases und nach gleich darauffolgendem Abkühlen des Glases tritt eine Blaufärbung an den beiden Röhren b und f auf. In diesen waren zum Blut einmal Ameisensäure, das andere Mal Salzsäure gesetzt.

Da bei Anstellung der Schwefelammonprobe unter gleichen Kautelen die zu erwartende Schwarzfärbung in den Röhrchen b und f ausblieb, so wurde auch hier die Blaufärbung nicht im Sinne einer positiven Eisenreaktion aufgefaßt (auch in keinem der anderen Röhrchen trat Schwarzfärbung ein). Sie wird

vielmehr in dem erwähnten, von Autenrieth betonten Sinne einer Zersetzung des Ferrozyankaliums in Gegenwart von Eiweiß aufgefaßt. Mit Rücksicht auf diese Autenrieth'sche Beobachtung wurde ein entsprechender Vergleichsversuch angestellt. Es wurde in einem Reagenzglas 1 ccm Serum mit 0,5 ccm Ferrozyankalium-Salzsäure Gemisch versetzt; der Inhalt der Röhrchen wurde erwärmt, es trat hierbei eine schwache Blaufärbung auf, die an Intensität die in den Röhrchen b und f eingetretene nicht erreichte. Ob die Intensität der Färbung durch die vorliegenden, differenten Mengenverhältnisse, durch die Mischung mit der Eigenfarbe des Blutes oder durch die gleichzeitige Anwesenheit der Säure bedingt ist, steht dahin.

Von dem Gedanken ausgehend, daß vielleicht fermentative Prozesse eher im Stande sein, das Blut aufzuspalten, wurden in einer weiteren Versuchsreihe differente Mengen gekochten Blutes 12 bis 32 Stunden lang der Einwirkung von

1. Pepsin-Salzsäure,
2. Trypsin,
3. Pepsin-Salzsäure und Trypsin

ausgesetzt.

Alle diese Versuche führten zu einem negativen Resultat. Zu negativem Resultat führten auch die von physiologischer Seite vorgeschlagenen Versuche durch Kochen des Blutes mit Laugen und anschließender Neutralisation des Gemisches das Eisen frei zu machen. Ich komme zu dem Ergebnis, mit den angeführten Versuchen läßt sich eine Abspaltung von Eisen aus dem Blut nicht bewerkstelligen.

Zunächst gaben wir die Versuche der Abspaltung des anorganischen Eisen aus organischer Kettung auf, zumal über diesen Gegenstand in physiologischer und chemischer Literatur nichts Einschlägiges zu finden war.

Gelegentlich einer Durchmusterung mikroskopischer Präparate von Knochenmaterial, an denen nach Entkalkung die Berliner-Blau-Reaktion angestellt war, fiel auf, daß mehrere der Knochenmarkszellen eisenhaltiges Pigment d. h. Hämosiderin enthielten. Dieser Befund ließ den Gedanken aufkommen, daß der Vorgang der postmortalen Imbibitionen der Knochen mit Eisen im wesentlichen beruhe auf einer Lösung des in den Knochenmarkzellen enthaltenen Hämosiderins durch die Konservierungsflüssigkeiten oder allein schon durch den eintretenden Zerfallsprozeß. Das Hämosiderin ist im Gegensatz zum Hämatoidin eisenhaltig. Neumann sagt in einer Arbeit „Beiträge zur Kenntnis der pathologischen Pigmente“:

Zur Entstehung des Hämosiderin gehört die Einwirkung des lebenden Gewebes bezw. seiner Zellen auf den Blutfarbstoff, mag er sich nun in gelöstem Zustand befinden oder an die Substanz der roten Blutzellen gebunden sein. Die Hämatoidinbildung dagegen stellt einen von vitaler Gewebstätigkeit unabhängigen chemischen Prozeß dar.

Die Angaben der Literatur über den physiologischen Hämosideringehalt der Knochenmarkszellen sind äußerst spärlich. Bei Neumann findet sich in der zitierten Arbeit folgende Notiz: „Nicht nur in mummifizierten Früchten, sondern auch bei Leichen von Kindern, die in mazeriertem Zustand geboren werden, finden sich regelmäßig innerhalb der Blutgefäße, sowie in den verschiedensten Geweben nadelförmige oder rhombische Hämatoidinkristalle abgeschieden, im ersteren Fall öfter so massenhaft, daß daraus sehr markierte gelbe Gewebsfärbungen entstehen (Lobsteins Cirrhonose), in letzterem Fall immer nur mikroskopisch nachweisbar. Nach eisenhaltigem Pigment habe ich in solchen Kinderleichen stets vergeblich gesucht “

Es geht aus dieser Notiz nicht hervor, ob Neumann spez. das Knochenmark einer Prüfung auf eisenhaltiges Pigment unterzogen hat. Und wäre es auch der Fall, so könnte man sich doch das Fehlen des Pigmentes bei diesen mazerierten Foeten dadurch erklären, daß das Protoplasma der abgestorbenen Zellen ein gutes Lösungsmittel für das Hämosiderin bildet. So schreibt z. B. M. B. Schmidt in einer Arbeit über die Verwandtschaft der hämatogenen und autochthonen Pigmente und deren Stellung zum sogen. Hämosiderin:

„Es bietet sich häufig Gelegenheit zu beobachten, wie das absterbende Protoplasma zum Lösungsmittel für das Pigment wird, so daß an die Stelle der Körner eine diffuse Färbung tritt."

Leider sind unsere Untersuchungen über den Hämosideringehalt der Embryonen, Neugeborenen und Erwachsenen verschiedener Spezies wie Mensch, Hund, Meerschweinchen, Kaninchen zur Zeit noch nicht abgeschlossen, so daß wir ein Urteil über die Bedeutung des Hämosiderins für die Entstehung der postmortalen Imbibitionen der Knochen mit Eisen noch nicht fällen können. Jedenfalls scheint uns jedoch der Gedanke sehr annehmbar, daß es sich bei diesem Prozeß tatsächlich um eine Lösung des Hämosiderins der Markzellen handelt, zumal alle Untersuchungen, so auch die von uns in dieser Richtung angestellten, darauf hinweisen, daß mikrochemisch nachweisbares Eisen, wie wir es im Hämosiderin vor uns haben, nicht durch chemischen Zerfallsprozeß, sondern allein durch die Wirkung der lebenden Zelle gebildet werden kann.

M. B. Schmidt machte experimentelle Studien über Hämosiderinbildung am Frosch, indem er Holunderplättchen von 100 bis 150 mm Dicke sich mit Herzblut eines Frosches voll-

saugen ließ und die Plättchen in den Lymphsack des Frosches brachte, um sie dort verschieden lange Zeit verweilen zu lassen. Er sagt über diese Untersuchungen:

„Es scheint mir, daß das Erwachen der Eisenreaktion mit dem neuen Stoffwechsel, welcher durch die Vaskularisation am Plättchen auflebt, in Zusammenhang zu bringen ist. Das sich bläuende Pigment gehört ausschließlich solchen Plättchen an, deren Thromben reichliche Gefäße enthalten. Daß das sich bläuende Pigment wirklich dasselbe ist, welches wochenlang ohne Reaktion an demselben Fleck gelegen hat und nicht etwa erst mit den Gefäßen eingewandert ist, geht daraus hervor, daß Holunderplättchen, welche leer in den Lymphsack eingeführt wurden, auch nach der Vaskularisation frei von Pigment blieben."

Es macht sich also bei dem Mangel an bereits vorliegenden Untersuchungen erforderlich den Hämosideringehalt von Markzellen der Knochen der Embryonen, Neugeborenen, Erwachsenen verschiedener Spezies sowohl frisch wie nach Konservierung an einem großen Material zu prüfen. Eine weitere Frage, die zu beantworten wäre, ist die, ob die Menge des in den Markzellen enthaltenen Eisenpigmentes hinreicht zur Erklärung der oft ungemein intensiv auftretenden positiven Eisenreaktion an der Knorpelknochengrenze.

Die Folgerungen, die ich aus den bisher vorliegenden Untersuchungen ziehe, sind:

1. Das frisch untersuchte Knochenmaterial von den Embryonen, Neugeborenen und Erwachsenen ist eisenfrei.
2. Das nicht mehr frische Knochenmaterial, welches entweder in Konservierungsflüssigkeiten gelegen hat oder sterilisiert und steril aufbewahrt ist oder dem

bakteriellen Fäulnisprozeß überlassen ist, zeigt nach gewissen Zeitabschnitten positive Eisenreaktion.

3. Die an diesem Material auftretende positive Reaktion ist aufzufassen als postmortale Imbibition des Knochens mit Eisen.
4. Worin im Grunde die postmortale Imbibition des Knochens mit Eisen besteht, welche Faktoren für ihr Zustandekommen von ausschlaggebender Bedeutung sind, ist z. Zt. noch nicht geklärt.
5. Mit Hilfe der von uns angestellten Versuche läßt sich nicht beweisen, daß eine Abspaltung des mikrochemisch nachweisbaren Eisens aus dem im Knochenblut organisch gebundenen Eisen stattfindet.
6. Die weiteren von uns angestellten Versuche lassen keine Abspaltung des Eisens aus dem Blute erkennen.
7. Mehrere mikroskopische Präparate von Knochendurchschnitten haben Hämosideringehalt der Markzellen gezeigt. Auf Grund dieser Befunde wird an die Möglichkeit gedacht, daß der Prozeß der postmortalen Imbibition auf einer Lösung des eventuell mit größerer Gesetzmäßigkeit sich in den Markzellen findenden Hämosiderins durch die Einwirkung des stets einsetzenden Absterbeprozesses der Zellen beruht.
8. Für die Entwicklung des Knochengewebes hat das mikrochemisch nachweisbare Eisen keine Bedeutung.

Zum Schluß meiner Arbeit sei es mir gestattet, meinem hochverehrten Chef und Lehrer, Herrn Professor Dr. Anschütz, für gütige Überlassung des Materials meinen ergebensten Dank zu sagen.

Zu großem Danke bin ich meinem hochgeschätzten und unvergeßlichen Lehrer, Herrn Professor Dr. Hans Noesske, für die Anregung zu der vorliegenden Arbeit sowohl, wie für die mir jeder Zeit erwiesene freundliche Unterstützung verpflichtet.

Lebenslauf.

Geboren wurde ich, Theodor, Bernhard, Paul Rupprecht, als Sohn des Kaufmanns Bernhard Rupprecht am 3. August 1887 zu Magdeburg. Hier besuchte ich das König Wilhelms-Gymnasium, an dem ich im März 1906 die Reifeprüfung bestand. In meinen fünf vorklinischen Semestern studierte ich an der Universität München.

Das ärztliche Vorexamen bestand ich im Sommersemester 1908.

Während meiner fünf klinischen Semester studierte ich an der Universität Kiel, wo ich im Mai 1911 das ärztliche Staatsexamen bestand.

Als Medizinalpraktikant bin ich vom 1. Juni bis 31. Dezember 1911 an der Kgl. Chirurgischen Universitätsklinik zu Kiel (Direktor: Professor Dr. Anschütz) und vom 1. Januar 1912 bis 31. Mai 1912 an der II. medizinischen Abteilung des Krankenhauses Moabit zu Berlin (Direktor: Professor Dr. Klemperer) tätig gewesen.